

## 酵母 $\beta$ -葡聚糖增溶改性与构效关系

张漫莉, 王强, 刘丽, 刘红芝\*

(中国农业科学院农产品加工研究所 农业农村部农产品加工重点实验室 北京 100193)

**摘要** 酵母  $\beta$ -葡聚糖具有良好的生物活性,然而溶解性差,应用范围较窄。为提高酵母  $\beta$ -葡聚糖的溶解性,扩大其应用范围,以水溶性  $\beta$ -葡聚糖得率为指标,考察酶添加量、底物质量浓度、温度、时间等因素对得率的影响,并利用响应面优化工艺,比较酶解前、后酵母  $\beta$ -葡聚糖的功能性质及结构的变化。结果表明:在酶添加量 4.30%,底物质量浓度 15 mg/mL,酶解温度 45  $^{\circ}$ C,酶解时间 83 min 的条件下,水溶性  $\beta$ -葡聚糖得率为 56.12%,溶解性达 89.74%,分子质量降为  $2.99 \times 10^6$ ,  $6.68 \times 10^4$  u 和  $1.40 \times 10^4$  u,  $D_{[4,3]}$  由 67.49  $\mu$ m 降至 38.25  $\mu$ m,热稳定性改善。红外图谱表明:酵母  $\beta$ -葡聚糖结构无明显变化,仍以  $\beta$ -1,3-糖苷键连接。圆二色谱表明:水溶性  $\beta$ -葡聚糖的不对称性增加,具有高度有序的结构。扫描电镜表明:酵母  $\beta$ -葡聚糖由完整的颗粒变为杂乱无章的片状结构。

**关键词** 酵母  $\beta$ -葡聚糖; 酶解工艺; 功能性质; 结构

文章编号 1009-7848(2022)05-0147-10 DOI: 10.16429/j.1009-7848.2022.05.017

酵母  $\beta$ -葡聚糖是酵母细胞壁的重要组成部分之一,由  $\beta$ -1,3-糖苷键为主链, $\beta$ -1,6-糖苷键为支链连接而成<sup>[1]</sup>,具有抗肿瘤<sup>[2-6]</sup>、抗氧化<sup>[7-8]</sup>、降血糖<sup>[9]</sup>、调节免疫力<sup>[10-12]</sup>、抗菌消炎<sup>[13]</sup>等多种生物活性。然而,其独特的三股螺旋结构,导致溶解性极低,在食品、药品等领域的应用受限。为改善酵母  $\beta$ -葡聚糖的溶解性,国内外学者对酵母  $\beta$ -葡聚糖进行修饰改性,包括辐照<sup>[14]</sup>、热降解<sup>[15]</sup>、离子液体-高压微射流<sup>[16]</sup>等物理改性方法,磷酸酯化<sup>[17]</sup>、硫酸酯化<sup>[18]</sup>、酸解与碱解结合<sup>[19]</sup>等化学改性方法,以及酶解<sup>[20]</sup>等生物改性方法。生物改性方法主要通过酶切断多糖内部的键,使其分子质量降低,以提高其溶解性。与物理、化学改性方法相比,生物改性法具有对环境友好、作用条件温和、高效专一等优点。

蜗牛酶是由纤维素酶、半纤维素酶、果胶酶等 40 多种酶组成的混合酶<sup>[21]</sup>,在食品、化妆品等领域应用广泛。李悦等<sup>[22]</sup>使用蜗牛酶降解茯苓多糖,以提高其水溶性,降解率达 40.20%;张涛等<sup>[23]</sup>采用蜗牛酶降解壳聚糖,寡糖得率可达 64.74%。可见,蜗牛酶降解多糖是一种提高多糖溶解性较为理想的方法,而蜗牛酶降解酵母  $\beta$ -葡聚糖的研究尚未报

道。本文使用蜗牛酶水解酵母  $\beta$ -葡聚糖,为水溶性酵母  $\beta$ -葡聚糖的工业化生产,以及扩大酵母  $\beta$ -葡聚糖的应用范围提供理论依据。

### 1 材料与方法

#### 1.1 材料与设备

酵母  $\beta$ -葡聚糖,安琪酵母有限公司;蜗牛酶,北京索莱宝有限公司;磷酸氢二钠、磷酸二氢钠,国药集团化学试剂有限公司(分析纯级)。

#### 1.2 仪器与设备

HH-S4 恒温震荡水浴锅,余姚市金表仪器有限公司;Freeze zone 6 真空冷冻干燥机,美国 Labconco 公司;YP5001 电子天平,梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司;LDO-9246A 烘箱,上海龙跃仪器设备有限公司;Seven Compact pH 计,梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司;HELEOS-II 十八角度激光光散射,美国 Wyatt 公司;Mastersizer 3000 激光粒度分析仪,马尔文仪器有限公司;J-1500 圆二色谱仪,日本分光株式会社;Q50 热重分析仪,美国 TA 公司。

#### 1.3 试验方法

1.3.1  $\beta$ -葡聚糖的酶解工艺 称取一定量的  $\beta$ -葡聚糖溶于水中,震荡水浴锅中预热 5 min 后加入蜗牛酶,反应一段时间后沸水浴 5 min 将酶灭活。试验初始条件为底物质量浓度 10 mg/mL,酶添加量 2%,温度 37  $^{\circ}$ C,反应时间 60 min。在离心

收稿日期: 2021-05-12

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(31671817)

作者简介: 张漫莉(1995—),女,硕士生

通信作者: 刘红芝 E-mail: liuhongzhi@caas.com

机中以 4 800 r/min 转速离心 15 min, 取 10 mL 上清液烘箱恒重法测总得率, 剩余样品冻干备用。

保持其它条件不变, 考察底物质量浓度(10, 15, 20, 25, 30 mg/mL)、温度(30, 35, 40, 45, 50 °C)、时间(50, 60, 70, 80, 90 min); 酶添加量(1%, 2%, 3%, 4%, 5%)对水溶性  $\beta$ -葡聚糖得率的影响。

1.3.2 响应面试验 根据单因素实验结果, 选择对水溶性  $\beta$ -葡聚糖得率影响较大的温度、时间和酶添加量进行响应面试验设计, 表 1 为响应面设计的因素编码及水平。

表 1 响应面试验设计因素及水平

Table 1 Factors and levels of response surface experiment

因素	水平		
	-1	0	1
温度/°C	35	45	55
酶添加量/%	2	4	6
时间/min	60	80	100

1.3.3 水溶性  $\beta$ -葡聚糖得率的测定 将冻干样品配制成适当浓度溶液测总糖和还原糖含量, 计算水溶性  $\beta$ -葡聚糖得率, 公式如下:

水溶性  $\beta$ -葡聚糖得率 (%) =  $(m_{\text{总}} - m_{\text{还}}) / \beta$ -葡聚糖的质量  $\times 100$

1.3.4 总糖含量测定 采用苯酚-硫酸法测定总糖含量<sup>[24]</sup>。

1.3.5 还原糖含量测定 采用 3,5-二硝基水杨酸法测定还原糖含量<sup>[25]</sup>。

1.3.6 溶解度测定 参考白文强<sup>[26]</sup>的方法并略作修改。取适量酶解处理前、后的  $\beta$ -葡聚糖样品溶于水, 搅拌 30 min 后, 4 000 r/min 离心 15 min, 取上清液放于恒重的带盖铝盒中, 105 °C 烘至恒重。

溶解度 (%) = 上清液中物质质量 /  $\beta$ -葡聚糖质量  $\times 100$

1.3.7 粒径分布 分别将酶解前、后的  $\beta$ -葡聚糖配制成溶液, 使用 Mastersizer-3000 测定酶解前、后  $\beta$ -葡聚糖的粒径分布。

1.3.8 分子质量测定 酶解前、后  $\beta$ -葡聚糖的分子质量测定所用的液相系统为 Agilent 1260, 色谱柱为 PL-gel MIXED-C 5  $\mu\text{m}$ , 以 0.1% NaCl 溶液为流动相和溶剂, 将  $\beta$ -葡聚糖配制成 1 mg/mL 溶

液, 0.45  $\mu\text{m}$  微膜过滤后进样。

1.3.9 热稳定性测定 参考范红梅<sup>[20]</sup>的方法并略作修改。采用热重分析仪研究酶解前、后  $\beta$ -葡聚糖的热稳定性变化。称取 6 mg 左右的固体粉末置于微型坩埚中,  $\text{N}_2$  为吹扫气体。温度由 30 °C 上升至 500 °C, 加热速度为 15 °C/min,  $\text{N}_2$  流速为 50 mL/min。

1.3.10 FT-IR 分析 将  $\beta$ -葡聚糖粉末与溴化钾混合、研磨并压片, 在 400~4 000  $\text{cm}^{-1}$  范围对样品进行红外扫描, 扫描次数为 64 次。

1.3.11 圆二色谱 参考 Forget 等<sup>[27]</sup>的方法并修改, 将  $\beta$ -葡聚糖配制成 1 mg/mL 溶液, 在 190~250 nm 的波长范围内, 以 100 nm/min 速度进行扫描, 比色皿的光程为 1 mm, 每个样品连续扫描 3 次。

1.3.12 扫描电镜 取适量样品, 用导电胶分别将酶解前、后的  $\beta$ -葡聚糖固定到样品台上, 在真空喷涂仪中进行喷金处理, 在 12.5 kV 电压下使用扫描电镜进行扫描观察, 拍摄  $\beta$ -葡聚糖的形貌。

1.3.13 数据处理 每组试验做 3 次平行, 软件 SPSS 26 对数据进行显著性分析, Design-expert 8.0.6 设计响应面试验, Origin 2019 进行作图。

## 2 结果与分析

### 2.1 单因素实验

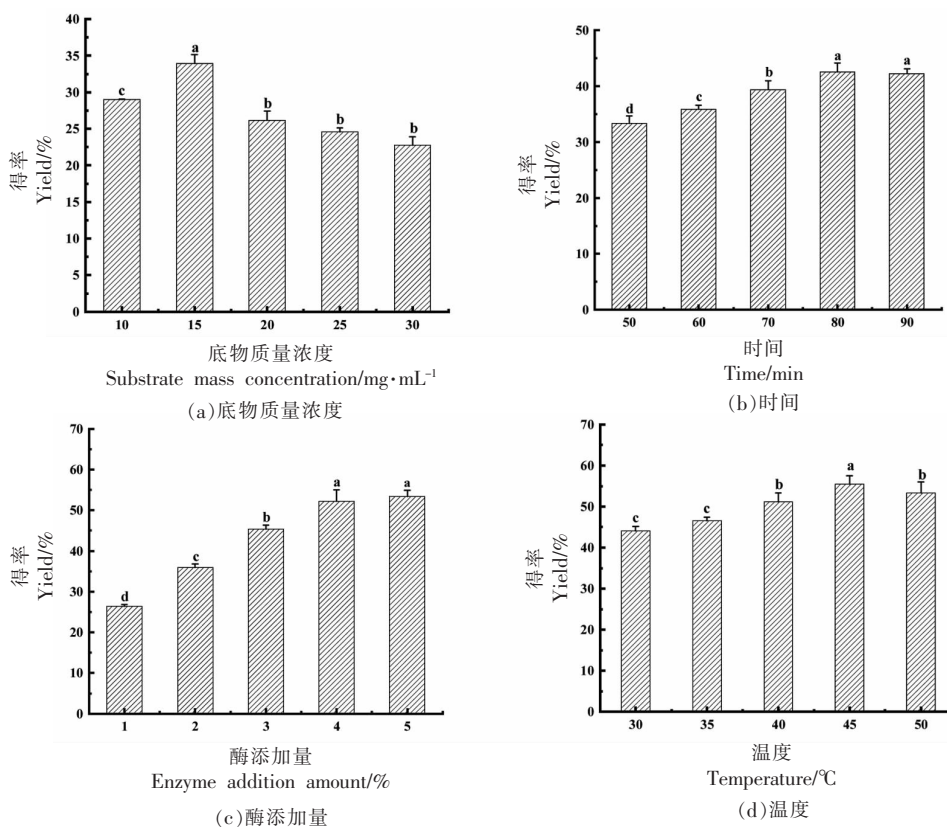
分别考察底物质量浓度、时间、酶添加量和温度对水溶性  $\beta$ -葡聚糖得率的影响, 如图 1a 所示, 随底物质量浓度的增加, 水溶性  $\beta$ -葡聚糖的得率先增加后降低, 在底物质量浓度为 15 mg/mL 时得率最高。这可能是在底物质量浓度较低时, 酶在溶液中自由活动, 与底物接触较容易, 有利于水解反应的进行; 当底物质量浓度继续增加, 由于  $\beta$ -葡聚糖的吸水性, 体系黏度增加, 酶在体系中运动困难, 与底物的接触受到阻碍<sup>[20]</sup>, 反应很难进行。

如图 1b 所示, 随着时间的增加, 水溶性  $\beta$ -葡聚糖的得率先缓慢升高后略有下降, 在水解时间为 80 min 时最高。这可能是由于水解时间较短时, 蜗牛酶将  $\beta$ -葡聚糖的糖苷键断裂, 使其水溶性增加; 当水解时间继续增加时, 蜗牛酶会进一步水解水溶性  $\beta$ -葡聚糖使其成为分子质量更小的糖<sup>[28]</sup>, 水溶性  $\beta$ -葡聚糖的得率略有下降。

如图 1c 所示, 随酶添加量的增加, 水溶性  $\beta$ -

葡聚糖的得率先增加后有所降低,在酶添加量为 4% 时得率最高。在酶添加量较低时,酶作用于酵母  $\beta$ -葡聚糖,水溶性  $\beta$ -葡聚糖的得率升高<sup>[29]</sup>;当酶添加量继续增加时,由于酶与底物达到饱和,多余的酶作用于水溶性  $\beta$ -葡聚糖使其分解成二糖或单糖。

如图 1d 所示,随温度的增加,水溶性  $\beta$ -葡聚糖的得率先增加后缓慢降低,在温度为 45 °C 时得率最高。在温度低于 45 °C 时,随温度增加,分子热运动增加,有利于底物与酶之间接触,水溶性  $\beta$ -葡聚糖的得率增加<sup>[8]</sup>;当温度高于 45 °C 时,酶的活性受到影响,因此水溶性  $\beta$ -葡聚糖的得率降低。



注:不同字母表示存在显著性差异( $P < 0.05$ )。

图 1 不同因素对水溶性  $\beta$ -葡聚糖得率的影响

Fig.1 Effects of different factors on water-soluble  $\beta$ -glucan yield

## 2.2 工艺优化

2.2.1 响应面试验设计及结果 为确定水溶性  $\beta$ -葡聚糖的最优工艺,以水溶性  $\beta$ -葡聚糖的得率为响应值,时间、温度和酶添加量作为自变量进行 Box-Behnken 试验设计,试验设计及结果如表 2 所示。

2.2.2 响应面回归模型及方差分析 利用 Design-Expert 8.0.6 进行多元回归拟合,所得二次多项回归模型方程为:  $Y = 56.63 - 0.92A + 2.92B + 4.09C + 1.05AB + 1.91AC - 0.24BC - 21.59A^2 - 12.45B^2 -$

$13.59C^2$ 。

由表 3 方差分析可知,该回归模型  $P < 0.0001$ ,回归效果极显著;失拟项  $P = 0.3911$ ,差异不显著,模型相关系数  $R^2 = 0.9955$ ,调整后  $R^2 = 0.9828$ ,表明模型拟合度较好,在误差允许的范围内,可以用该模型预测水溶性  $\beta$ -葡聚糖的得率。此外,各项式中  $B$ 、 $C$ 、 $A^2$ 、 $B^2$ 、 $C^2$ 、 $AC$  对水溶性  $\beta$ -葡聚糖的得率影响极显著, $A$  对水溶性  $\beta$ -葡聚糖的得率影响显著;各因素对水溶性  $\beta$ -葡聚糖得率影响的顺序是:酶添加量 > 时间 > 温度。

表2 响应面试验设计及结果

Table 2 Experimental design and results for response surface analysis

序号	温度(A)/ ℃	时间(B)/ min	酶添加量(C)/ %	得率(Y)/ %	序号	温度(A)/ ℃	时间(B)/ min	酶添加量(C)/ %	得率(Y)/ %
1	1	1	0	25.95	10	1	0	1	26.52
2	0	1	-1	30.29	11	-1	-1	0	21.32
3	0	0	0	57.89	12	1	-1	0	18.33
4	0	-1	1	31.35	13	-1	1	0	24.72
5	1	0	-1	13.57	14	0	0	0	57.28
6	0	-1	-1	23.67	15	-1	0	1	25.50
7	0	0	0	55.28	16	0	0	0	56.40
8	-1	0	-1	20.18	17	0	1	1	37.03
9	0	0	0	56.28					

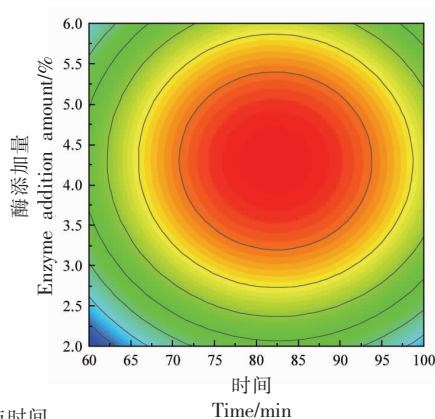
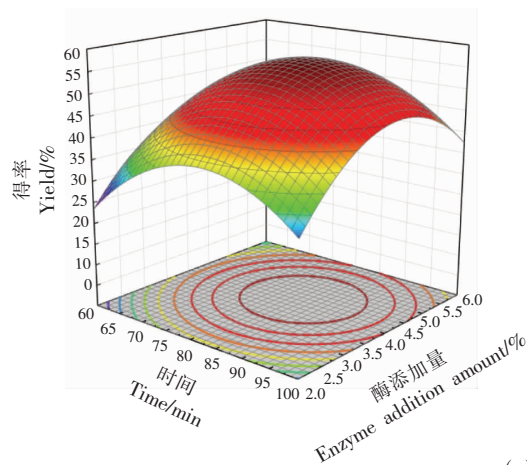
表3 回归模型方差分析

Table 3 Analysis of variance of regression model

来源	自由度	平方和	均方	F值	P值
模型	9	3 983.55	442.84	392.43	<0.0001**
A	1	6.75	6.75	5.98	0.0444*
B	1	67.98	67.98	60.24	0.0001**
C	1	133.58	133.58	118.37	<0.0001**
AB	1	4.45	4.45	3.95	0.0874
AC	1	14.55	14.55	12.90	0.0088**
BC	1	0.22	0.22	0.20	0.6715
A <sup>2</sup>	1	1 963.42	1 963.42	1 739.93	<0.0001**
B <sup>2</sup>	1	652.83	652.83	578.52	<0.0001**
C <sup>2</sup>	1	777.55	777.55	689.04	<0.0001**
残差	7	7.90	1.33		
失拟项	3	3.89	1.30	1.29	0.3911
纯误差	4	4.01	1.00		

2.2.3 交互作用分析 各因素的交互作用如图2所示。图2a中,水溶性 $\beta$ -葡聚糖的得率随酶添加量和时间的增加先增加后降低,且等高线图呈偏椭圆形,表明两因素的交互作用不显著;图2b中,水溶性 $\beta$ -葡聚糖的得率随酶添加量与温度的增加

先增加后降低,等高线图呈椭圆形,表明两因素间存在一定的相互作用;图2c中,水溶性 $\beta$ -葡聚糖的得率随时间和温度的增加先增加后下降,等高线图呈偏椭圆形但两条线之间间隔较大,表明交互作用影响较弱。



(a) 酶添加量与时间

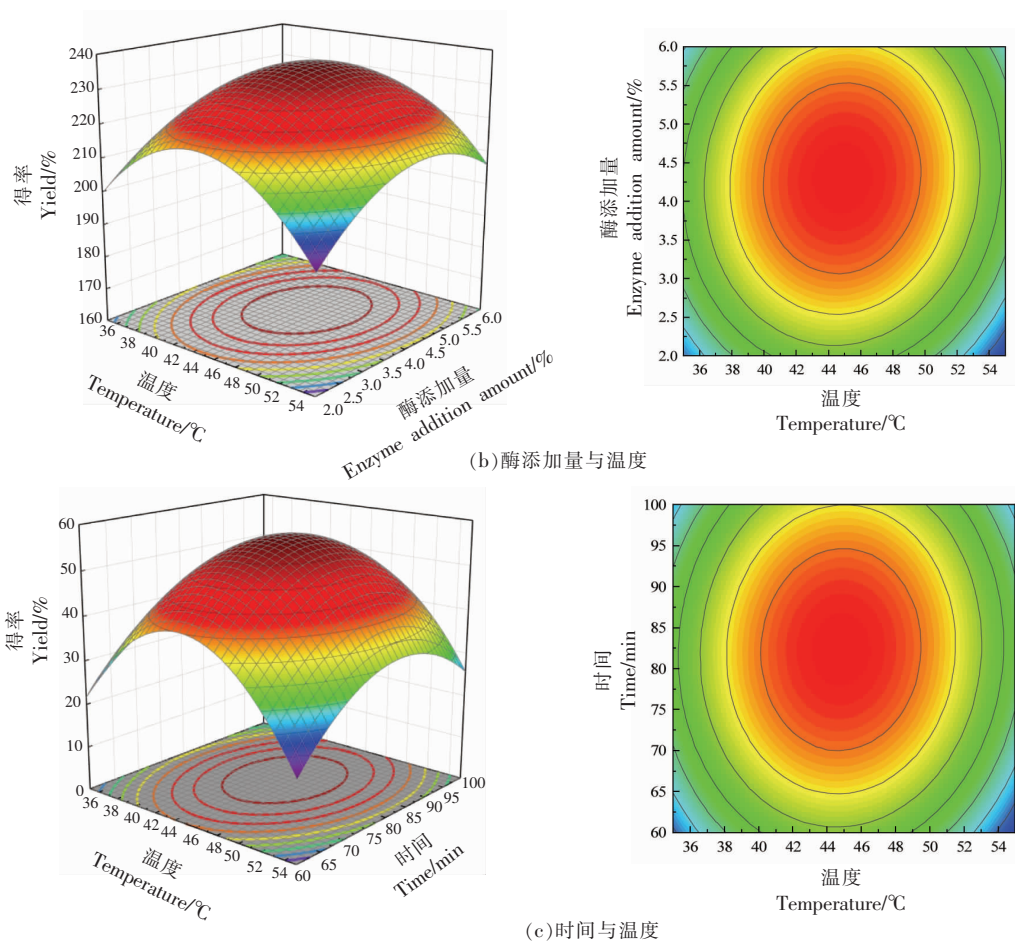


图 2 酶添加量、时间和温度交互作用对水溶性  $\beta$ -葡聚糖得率的影响

Fig.2 Interactive effects of enzyme addition amount, time and temperature on the yield of water-soluble  $\beta$ -glucan

2.2.4 验证试验 响应面预测最佳条件：温度 44.88  $^{\circ}\text{C}$ ，时间 82.29 min，酶添加量 4.30%。结合试验条件，将优化条件修正为温度 45  $^{\circ}\text{C}$ ，时间 83 min，酶添加量为 4.30%。该条件下得到的水溶性  $\beta$ -葡聚糖得率的平均值为 56.12%，和预测值无显著性差异，这表明优化后的最佳条件是可靠的，可将该回归方程应用到实际。

### 2.3 溶解度

$\beta$ -葡聚糖酶解前、后溶解性变化如图 3 所示， $\beta$ -葡聚糖几乎不溶于水中，经过酶解处理，水溶性  $\beta$ -葡聚糖的溶解性可达  $(89.74 \pm 0.62)\%$ ，显著高于  $\beta$ -葡聚糖的溶解性；白文强<sup>[26]</sup>通过离子液体与微射流协同作用酵母  $\beta$ -葡聚糖使其溶解性提高到  $(85.01 \pm 0.45)\%$ ，石继奎等<sup>[30]</sup>通过机械活化使酵母  $\beta$ -葡聚糖的溶解性提高到 37%。

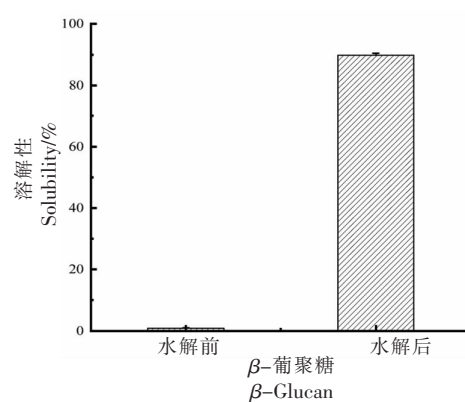


图 3 酶解前、后  $\beta$ -葡聚糖的溶解度

Fig.3 The solubility of  $\beta$ -glucan before and after enzymatic hydrolysis

### 2.4 分子质量分布

基于本课题组前期研究， $\beta$ -葡聚糖的分子质量为  $6.09 \times 10^6$  u， $M_w/M_n$  为 1.38<sup>[31]</sup>。经过酶解后， $\beta$ -

葡聚糖分解成不同片段,其分子质量分别为  $2.99 \times 10^6$ ,  $6.68 \times 10^4$  u 和  $1.40 \times 10^4$  u,  $M_w/M_n$  分别为 2.71, 1.31 和 1.54, 这表明酶作用于  $\beta$ -1,3-糖苷键降低  $\beta$ -葡聚糖的分子质量。与本文提高溶解性方式相同,段会轲<sup>[32]</sup>使用  $\beta$ -1,3-葡聚糖酶水解酵母  $\beta$ -葡聚糖,所得到的酶解产物分子质量降至  $6.38 \times 10^5$  u 和  $4.78 \times 10^4$  u 且大分子产物具有抗癌作用;也有辐照处理提高溶解性的研究,辐照处理后酵母  $\beta$ -葡聚糖的分子质量由 175 ku 降至 27.9 ku,且产物具有更好的抗氧化性和抗菌活性<sup>[33]</sup>。

## 2.5 粒径

$\beta$ -葡聚糖的粒径变化如图 5 所示,与  $\beta$ -葡聚糖的粒径相比,水溶性  $\beta$ -葡聚糖的粒径向左移动,  $D_{[4.3]}$  由  $67.49 \mu\text{m}$  降低至  $38.25 \mu\text{m}$ , 表明酶解可以减少颗粒尺寸。与 Liu 等<sup>[34]</sup>研究的酶修饰猴头菇多糖结果相似,猴头菇多糖经过酶解处理粒径由 396 nm 降低至 122 nm。多糖的粒径与分子质量、内在黏度和物理稳定性有关,粒径降低,分子质量和黏度也会降低<sup>[35]</sup>,物理稳定性提高<sup>[36]</sup>。

## 2.6 热稳定性

使用热重分析仪比较酶解前、后  $\beta$ -葡聚糖的热稳定性变化。由图 6 可知,热损失分为 2 个阶段:第 1 阶段为 200  $^{\circ}\text{C}$  以下,葡聚糖发生 9.82% 的质量损失和水溶性  $\beta$ -葡聚糖发生 6.54% 的质量损失,这是由于水分的蒸发或者水中氢键的解析;第 2 阶段为 200~500  $^{\circ}\text{C}$ ,该阶段质量损失较大, $\beta$ -葡聚糖和水溶性  $\beta$ -葡聚糖的热分解温度分别开始于 249.8  $^{\circ}\text{C}$  和 241.0  $^{\circ}\text{C}$ ,而当温度达到 500  $^{\circ}\text{C}$  时, $\beta$ -葡聚糖和水溶性  $\beta$ -葡聚糖的质量损失分别达到 88.98% 和 69.50%。与范红梅<sup>[20]</sup>和 Xu 等<sup>[37]</sup>的研究结果相似,这部分的质量损失源自  $\beta$ -葡聚糖和水溶性  $\beta$ -葡聚糖的降解。

## 2.7 二级结构分析

酶解前、后的酵母  $\beta$ -葡聚糖红外光谱图如图 7 所示。样品在 1 030, 1 369, 1 651, 2 924, 3 423  $\text{cm}^{-1}$  处的吸收峰均为多糖特征吸收峰<sup>[38]</sup>, 1 030  $\text{cm}^{-1}$  处吸收峰是  $-\text{COO}$  的  $\text{C}=\text{O}$  的伸缩振动<sup>[39]</sup>; 1 369  $\text{cm}^{-1}$  和 2 924  $\text{cm}^{-1}$  分别属于  $\text{C}-\text{H}$  的变角振动<sup>[39]</sup>、伸缩振动<sup>[40]</sup>; 3 423  $\text{cm}^{-1}$  处的宽峰是  $\text{O}-\text{H}$  的伸缩振动<sup>[28]</sup>。2 924  $\text{cm}^{-1}$  和 1 369  $\text{cm}^{-1}$  处的吸收峰可表明酶解后  $\beta$ -葡聚糖仍以  $\beta$ -(1,3)-糖苷键连

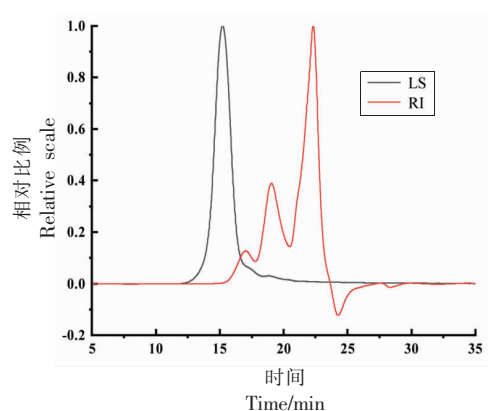


图 4 水溶性  $\beta$ -葡聚糖分子质量图谱

Fig.4 The molecular weight of water-soluble  $\beta$ -glucan

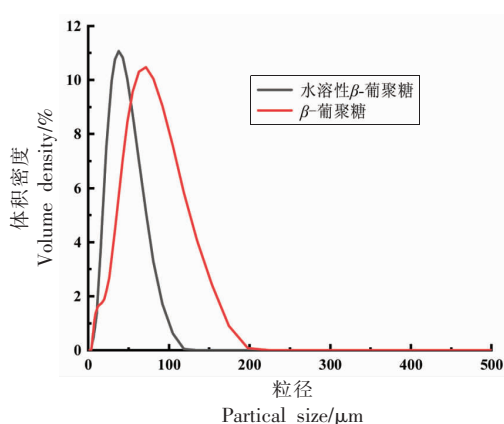


图 5 酶解前、后  $\beta$ -葡聚糖的粒径

Fig.5 Partical size of  $\beta$ -glucan before and after enzymatic hydrolysis

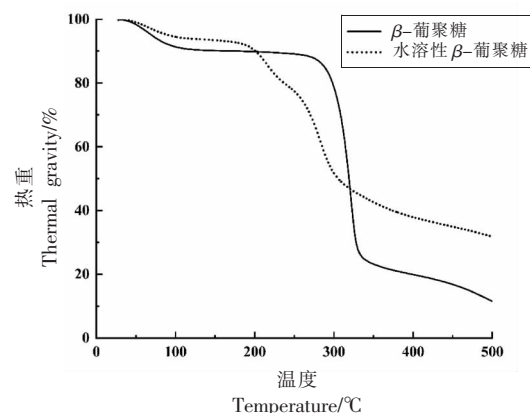


图 6 酶解前、后  $\beta$ -葡聚糖的热重分析

Fig.6 Thermogravimetric analysis of  $\beta$ -glucan before and after enzymatic hydrolysis

接<sup>[26,41]</sup>。

圆二色谱是研究生物大分子结构改变的一种快速、灵敏的手段,与蛋白质的  $\alpha$ -螺旋、 $\beta$ -折叠等

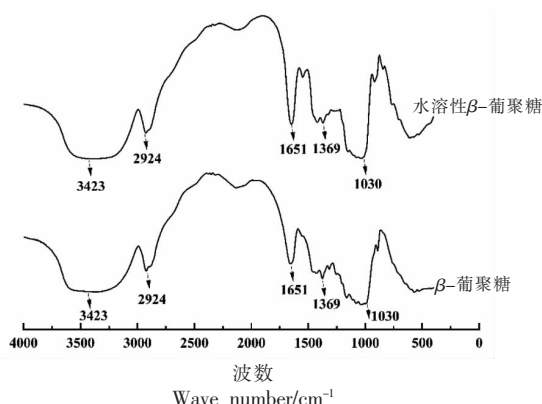
图 7 酶解前、后  $\beta$ -葡聚糖的红外光谱图

Fig.7 FT-IR of  $\beta$ -glucan before and after enzymatic hydrolysis

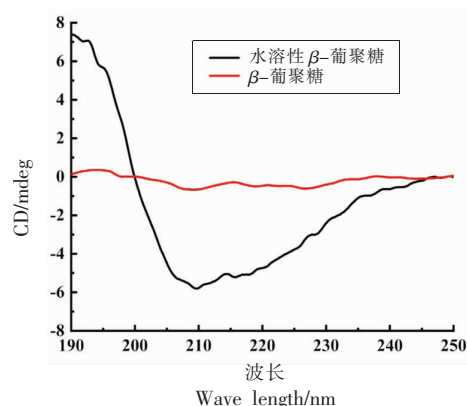
图 8 酶解前、后  $\beta$ -葡聚糖的圆二色谱图

Fig.8 Circular dichroism spectra of  $\beta$ -glucan before and after enzymatic hydrolysis

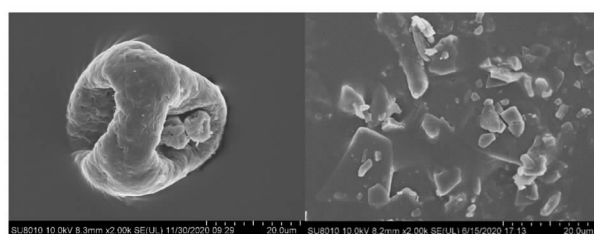
结构有所不同,多糖多以无规卷曲等灵活的结构存在。图 8 显示了酶解处理前、后  $\beta$ -葡聚糖的结构变化,水溶性  $\beta$ -葡聚糖较未处理的  $\beta$ -葡聚糖不对称性增加,且存在正负科顿效应,表明水溶性  $\beta$ -葡聚糖具有高度有序的结构<sup>[42]</sup>。Forget 等<sup>[27]</sup>在比较琼脂糖与羧甲基琼脂糖时发现,羧甲基化后琼脂糖在 183 nm 处的正吸收峰移动到在 191 nm 处,该吸收峰为  $\alpha$  螺旋结构,在 203 nm 处出现一个新的吸收峰,与蛋白质在 217 nm 处的  $\beta$ -折叠结构相似。在水溶性  $\beta$ -葡聚糖中,可看到在 190 nm 和 210 nm 处分别存在正吸收峰和负吸收峰,这表明其存在  $\alpha$ -螺旋结构和类  $\beta$ -折叠结构。

## 2.8 显微结构

酶解前、后  $\beta$ -葡聚糖得微观形态如图 9 所示。经过酶解处理后, $\beta$ -葡聚糖得微观形态变化明显,酶解前  $\beta$ -葡聚糖表面较光滑,呈球状;酶解后  $\beta$ -葡聚糖颗粒变小,呈大小不均且杂乱无章的片状结构,这有利于其与水分子的接触,改善溶解性。

## 3 结论

本文研究了蜗牛酶改善  $\beta$ -葡聚糖溶解性的工艺、产物溶解性、热稳定性与结构变化。通过单因素实验和响应面试验,得到水溶性  $\beta$ -葡聚糖的最佳工艺为:底物质量浓度 15 mg/mL,温度 45  $^{\circ}$ C,时间 83 min,酶添加量 4.30%,该条件下水溶性  $\beta$ -葡聚糖的得率最高。水溶性  $\beta$ -葡聚糖较  $\beta$ -葡聚糖的溶解性显著提高,分子质量降低,热稳定性增



(a) 酶解前

(b) 酶解后

图 9 酶解前、后  $\beta$ -葡聚糖的扫描电镜图

Fig.9 Scanning electron microscope images of  $\beta$ -glucan before and after enzymatic hydrolysis

加;红外光谱分析表明,水溶性  $\beta$ -葡聚糖与  $\beta$ -葡聚糖图谱相似,仍以  $\beta$ -1,3-糖苷键连接,圆二色谱表明,水溶性  $\beta$ -葡聚糖的不对称性增加;SEM 表明  $\beta$ -葡聚糖经过酶解后表面遭到破坏,更利于与水分子的接触。 $\beta$ -葡聚糖溶解性的改善为其在食品、药品、化妆品中的应用提供理论基础。

## 参 考 文 献

- [1] VOLMAN J J, RAMAKERS J D, PLAT J. Dietary modulation of immune function by  $\beta$ -glucans [J]. *Physiology & Behavior*, 2008, 94(2): 276-284.
- [2] QI C J, CAI Y H, GUNN L, et al. Differential pathways regulating innate and adaptive antitumor immune responses by particulate and soluble yeast-derived  $\beta$ -glucans [J]. *Immunobiology*, 2015, 117(25): 6825-6836.
- [3] MO L, CHEN Y F, LI W J, et al. Anti-tumor effects of (1 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -D-glucan from *Saccharomyces*

- cerevisiae* in S180 tumor-bearing mice[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2017, 95: 385-392.
- [4] SALVADOR C, LI B, HANSEN R, et al. Yeast-derived  $\beta$ -glucan augments the therapeutic efficacy mediated by anti-vascular endothelial growth factor monoclonal antibody in human carcinoma xenograft models[J]. Clinical Cancer Research, 2008, 14(4): 1239.
- [5] CHAN A H S, HOFFMANN E R. Simulation reality and stereotype strength: A problem for equipment designers[J]. International Journal of Industrial Ergonomics, 2014, 44(1): 1-10.
- [6] WANG N N, LIU H Z, LIU G J, et al. Yeast beta-D-glucan exerts antitumour activity in liver cancer through impairing autophagy and lysosomal function, promoting reactive oxygen species production and apoptosis[J]. Redox Biology, 2020, 32: 101495.
- [7] MEI X Y, TANG Q L, HUANG G L, et al. Preparation, structural analysis and antioxidant activities of phosphorylated (1 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -D-glucan[J]. Food Chemistry, 2020, 309: 125791.
- [8] SALAH A S, EL NAHAS A F, MAHMOUD S. Modulatory effect of different doses of  $\beta$ -1,3/1,6-glucan on the expression of antioxidant, inflammatory, stress and immune-related genes of *Oreochromis niloticus* challenged with *Streptococcus iniae*[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2017, 70: 204-213.
- [9] CAO Y, SUN Y, ZOU S W, et al. Orally administered baker's yeast  $\beta$ -glucan promotes glucose and lipid homeostasis in the livers of obesity and diabetes model mice [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2017, 65(44): 9665-9674.
- [10] BAI N, GU M, ZHANG W B, et al. Effects of  $\beta$ -glucan derivatives on the immunity of white shrimp *Litopenaeus vannamei* and its resistance against white spot syndrome virus infection [J]. Aquaculture, 2014, 426-427: 66-73.
- [11] ZHANG M, JIN X, YANG Y F.  $\beta$ -Glucan from *Saccharomyces cerevisiae* induces SBD-1 production in ovine ruminal epithelial cells via the Dectin-1-Syk-NF- $\kappa$ B signaling pathway[J]. Cellular Signalling, 2019, (53): 304-315.
- [12] EL-BOSHY M E, EL-ASHRAM A M, ABDELHAMID F M, et al. Immunomodulatory effect of dietary *Saccharomyces cerevisiae*,  $\beta$ -glucan and laminaran in mercuric chloride treated Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) and experimentally infected with *Aeromonas hydrophila*[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2010, 28(5): 802-808.
- [13] FRANCELENO ANDRADE E, VIEIRA LOBATO R, VASQUES ARAUJO T, et al. Effect of beta-glucans in the control of blood glucose levels of diabetic patients: A systematic review[J]. Nutr Hosp, 2014, 31(1): 170-177.
- [14] 刘媛媛. 酵母细胞壁多糖制备及流变学性质研究[D]. 北京: 中国农业科学院, 2010.
- LIU Y Y. Study on the preparation of cell wall polysaccharides from *Saccharomyces cerevisiae* and its rheological properties [D]. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2010.
- [15] ISHIMOTO Y, ISHIBASHI K I, YAMANAKA D, et al. Modulation of an innate immune response by soluble yeast  $\beta$ -glucan prepared by a heat degradation method [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2017, 104(Pt A): 367-376.
- [16] 高洁. 酵母 $\beta$ -葡聚糖制备、改性增溶和溶液构象研究[D]. 北京: 中国农业科学院, 2013.
- GAO J. Study on the preparation, modification and solution conformation of  $\beta$ -glucan in *Saccharomyces cerevisiae* [D]. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2013.
- [17] 张学况, 杜丽平, 王超, 等. 酶解法增溶酵母(1 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -D-葡聚糖的研究[J]. 食品与发酵工业, 2012, 38(7): 48-52.
- ZHANG X K, DU L P, WANG C, et al. An enzymolysis method for the solubilization of yeast (1 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -D-glucan[J]. Food and Fermentation Industries, 2012, 38(7): 48-52.
- [18] 刘晓永. 酿酒酵母 $\beta$ -D-葡聚糖制备、构象及免疫功效研究[D]. 无锡: 江南大学, 2007.
- LIU X Y. Studies on the preparation, conformation and immunobiological activity of  $\beta$ -D-glucans in *Saccharomyces cerevisiae* [D]. Wuxi: Jiangnan University, 2007.
- [19] ZHENG Z M, HUANG Q L, LUO X G, et al. Effects and mechanisms of ultrasound- and alkali-assisted enzymolysis on production of water-soluble yeast  $\beta$ -glucan [J]. Bioresource Technology, 2019, (273): 394-403.
- [20] 范红梅. 酵母 $\beta$ -葡聚糖酶解改性及其应用[D]. 天津: 天津科技大学, 2018.



- FAN H M. Enzyme modification of yeast  $\beta$ -glucan and its application[D]. Tianjin: Tianjin University of Science & Technology, 2018.
- [21] 中国科学院生物物理研究所三室. 蜗牛酶的制备和对酵母细胞壁的作用[J]. 生物化学与生物物理进展, 1978(6): 2, 4-5, 47.  
Laboratory 3, Institute of Biophysics, Chinese Academy of Sciences. Preparation of snail enzymes and effects on yeast cell walls[J]. Advances in Biochemistry and Biophysics, 1978(6): 2, 4-5, 47.
- [22] 李悦, 吴和珍, 叶丛进, 等. 蜗牛酶辅助降解茯苓多糖工艺优化研究[J]. 亚太传统医药, 2016, 12(4): 53-55.  
LI Y, WU H Z, YE C J, et al. Research on the optimization of auxiliary extraction process in *Poria cocos* polysaccharides by snailase [J]. Asia-Pacific Traditional Medicine, 2016, 12(4): 53-55.
- [23] 张涛, 吴昌英, 张永模, 等. 蜗牛酶降解壳聚糖制备壳寡糖的研究[J]. 华西药学杂志, 2010, 3(25): 313-315.  
ZHANG T, WU C Y, ZHANG Y M, et al. Study on chitooligosaccharide production by chitosan hydrolysis with snailase [J]. West China Journal of Pharmaceutical Sciences, 2010, 3(25): 313-315.
- [24] DUBOIS M, GILLES K A, HAMILTON J K, et al. Colorimetric method for determination of sugars and related substances [J]. Analytical Chemistry, 1956, 28(3): 350-356.
- [25] MILLER J D B. Britain, the Commonwealth and European integration [J]. Australian Outlook, 1959, 13(1): 3-18.
- [26] 白文强. 基于离子液体与微射流协同作用的酵母 $\beta$ -葡聚糖增溶机制研究[D]. 北京: 中国农业科学院, 2019.  
BAI W Q. Dissolution mechanisms of yeast  $\beta$ -D-glucan modification by the ionic liquid combined with high pressure microfluidization [D]. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2019.
- [27] FORGET A, CHRISTENSEN J, LUDEKE S, et al. Polysaccharide hydrogels with tunable stiffness and provasculogenic properties via  $\alpha$ -helix to  $\beta$ -sheet switch in secondary structure[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2013, 110(32): 12887-12892.
- [28] WU Q, QIN D D, CAO H X, et al. Enzymatic hydrolysis of polysaccharide from *Auricularia auricula* and characterization of the degradation product [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2020, 162: 127-135.
- [29] CHEN M, ZHAO J, XIA L. Enzymatic hydrolysis of maize straw polysaccharides for the production of reducing sugars[J]. Carbohydrate Polymers, 2008, 71(3): 411-415.
- [30] 石纪奎, 李永富, 史锋. 机械活化酿酒酵母葡聚糖改善其水溶性[J]. 食品与生物技术学报, 2015, 34(5): 536-541.  
SHI J K, LI Y F, SHI F. Water-solubility of  $\beta$ -D-glucan from *Saccharomyces cerevisiae* by mechanical activation[J]. Journal of Food Science and Biotechnology, 2015, 34(5): 536-541.
- [31] LIU H Z, BAI W Q, HE L, et al. Degradation mechanism of *Saccharomyces cerevisiae*  $\beta$ -D-glucan by ionic liquid and dynamic high pressure microfluidization [J]. Carbohydrate Polymers, 2020, 241: 116123.
- [32] 段会轲. 水溶性酵母 $\beta$ -1,3-葡聚糖的酶法制备及其抗肿瘤活性研究[D]. 武汉: 华中农业大学, 2007.  
DUAN H K. Anti-tumor activity of enzymatic hydrolysates of  $\beta$ -1,3-glucan from *Saccharomyces cerevisiae*[D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2007.
- [33] KHAN A A, GANI A, MASOODI F A, et al. Structural, thermal, functional, antioxidant & antimicrobial properties of  $\beta$ -D-glucan extracted from baker's yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) - Effect of  $\gamma$ -irradiation[J]. Carbohydrate Polymers, 2016, 140: 442-450.
- [34] LIU X P, REN Z R, YU R H, et al. Structural characterization of enzymatic modification of *Herici-um erinaceus* polysaccharide and its immune-enhancement activity[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2020, 166: 1396-1408.
- [35] CHEN X W, QI Y J, ZHU C H, et al. Effect of ultrasound on the properties and antioxidant activity of hawthorn pectin[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2019, 131: 273-281.
- [36] WEI Y, CAI Z X, WU M, et al. Comparative studies on the stabilization of pea protein dispersions by using various polysaccharides[J]. Food Hydrocolloids, 2020, 98: 105233.
- [37] XU Y, ZHANG X, YAN X H, et al. Characterization, hypolipidemic and antioxidant activities of de-

- graded polysaccharides from *Ganoderma lucidum* [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2019, 135: 706–716.
- [38] 张惟杰. 糖复合物生化研究技术 [M]. 杭州: 浙江大学出版社, 1999: 193–198.
- ZHANG W J. Biochemical research techniques for sugar complexes [M]. Huangzhou: Zhejiang University Press, 1999: 193–198.
- [39] XU A R, GUO X, ZHANG Y B, et al. Efficient and sustainable solvents for lignin dissolution: Aqueous choline carboxylate solutions [J]. Green Chemistry, 2017, 19(17): 4067–4073.
- [40] TANG J, NIE J, LI D P, et al. Characterization and antioxidant activities of degraded polysaccharides from *Poria cocos sclerotium* [J]. Carbohydrate Polymers, 2014, 105: 121–126.
- [41] LIU C M, LIANG R H, DAI T T, et al. Effect of dynamic high pressure microfluidization modified insoluble dietary fiber on gelatinization and rheology of rice starch [J]. Food Hydrocolloids, 2016, 57: 55–61.
- [42] WANG H S, CHEN J R, REN P F, et al. Ultrasound irradiation alters the spatial structure and improves the antioxidant activity of the yellow tea polysaccharide [J]. Ultrason Sonochem, 2021, 70: 105355.

### The Solubilization Modification and Structure–activity Relationship of Yeast $\beta$ -Glucan

Zhang Manli, Wang Qiang, Liu Li, Liu Hongzhi\*

(Key Laboratory of Agro-products Processing, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Institute of Food Science and Technology, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100193)

**Abstract** Yeast  $\beta$ -glucan has attracted much attention due to its good biological activity, but its low solubility limits its application. In order to improve the solubility of  $\beta$ -glucan and expand its application range, the effects of enzyme dosage, substrate concentration, temperature and time on the yield of water-soluble  $\beta$ -glucan were investigated. The process was optimized by response surface methodology. The functional properties and structural changes of  $\beta$ -glucan before and after enzymatic hydrolysis were compared. The results showed that the yield of water-soluble  $\beta$ -glucan was 56.12% under the conditions of enzyme dosage 4.30%, substrate mass concentration 15 mg/mL, enzymolysis temperature 45 °C, enzymolysis time 83 min. The solubility of the product was reached 89.74%, the molecular weight was decreased to  $2.99 \times 10^6$ ,  $6.88 \times 10^4$  u and  $1.40 \times 10^4$  u,  $D_{[4,3]}$  was decreased from 67.49  $\mu\text{m}$  to 38.25  $\mu\text{m}$ , and the thermal stability was improved. The structure of  $\beta$ -glucan remained unchanged, which was still connected with  $\beta$ -1,3-glycoside bond. Circular dichroism chromatography showed that the asymmetry of water-soluble  $\beta$ -glucan was increased and the structure was highly ordered. Scanning electron microscope showed that the yeast  $\beta$ -glucan was changed from intact granules to irregular slice shape.

**Keywords** yeast  $\beta$ -glucan; enzymatic hydrolysis process; functional properties; structure